



**GRADO EN MEDICINA**

# **Trabajo Fin de Grado**

AUTOR: Francisco José Palazón Roca

**DEPARTAMENTO: Medicina**

**LABORATORIO: Neurobiotecnología**

**TÍTULO: “Neuroinflamación en septum inducida por dieta grasa”**

## **RESUMEN**

El alto índice de sobrepeso y obesidad que presenta la población se ha convertido en la pandemia de nuestro tiempo. El tejido graso es un órgano endocrino con capacidad para sintetizar y segregar citocinas pro-inflamatorias, lo que puede dar lugar a procesos de inflamación crónica y neuroinflamación, que, a su vez, puede alterar la capacidad cognitiva. Existe una gran evidencia de las propiedades anti-inflamatorias de diversas fitohormonas como: curcumina, jasmonatos, ácido acetil salicílico, y el ácido abscísico (ABA). La capacidad de estas fitohormonas para prevenir la neuroinflamación se ha demostrado en estudios preclínicos y clínicos.

En este trabajo estudiamos el efecto beneficioso del ABA en mejorar los efectos deletéreos de la neuroinflamación en un modelo animal de dieta grasa. En particular, estudiamos el área septal, puesto que esta región cerebral desempeña un papel fundamental en la regulación del hipocampo y la memoria espacial. Nuestra hipótesis de trabajo es que la neuroinflamación podría afectar el área septal y esto podría inducir los déficits de memoria observados en estos animales. Estudios previos del grupo habían demostrado que ABA puede contrarrestar los defectos cognitivos de animales sometidos a dieta grasa. Por tanto, queríamos conocer si la neuroinflamación en el área septal correlacionaba con el comportamiento de memoria espacial. Para comprobar la hipótesis, se cuantificaron células de microglía en el septum de ratas alimentadas con dieta estándar o dieta rica en grasa, con o sin ABA. Los resultados obtenidos indican que la dieta grasa aumenta la neuroinflamación inducida en el área septal mientras que el tratamiento con ABA es capaz de contrarrestar este efecto.

Conclusión, la neuroinflamación en septum correlaciona con las alteraciones en memoria espacial observadas en animales sometidos a dieta grasa comparados con control.

**Palabras clave:** obesidad, neuroinflamación, fitohormona.

## **ABSTRACT**

The issue of overweight in the society has become the pandemic nowadays. Adipose tissue is an endocrine organ which can develop a chronic inflammation process due to a constant liberation of pro-inflammatory cytokines. It can cause neuroinflammation, which results in cognitive capacity problems. There are evidences of the anti-inflammatory properties of diverse plant hormones like: curcumin, jasmonate and acetylsalicylic acid, etc...; we want to highlight the role that plant hormone abscisic acid (ABA) can mean to prevent a massive neuroinflammation.

In this project, we will study the ABA beneficial effect to improve the deleterious effects of neuroinflammation in an animal model of high-fat-diet. We will focus on septum area, because this cerebral region helps hippocampus region and spatial memory. Our hypothesis is neuroinflammation could affect the septum area and affect memory alteration, which are observed in those animals. ABA is able to counteract the inflammation in all cerebral areas, also in septum, improving the behavior of memory. To test our hypothesis, microglia cells in Wistar rats septum fed with standard diets or HFD, with or without ABA, were quantified. The results show high-fat-diet increase neuroinflammation in septum can be increased in HFD rats if ABA can counteract this effect.

Neuroinflammation in septum could be hidden alterations in spatial memory, which are observed in animals fed with high-fat-diet compared with control.

**Keywords:** obesity; neuroinflammation; plant hormone.

## EXTENDED SUMMARY

The issue of overweight in the society has become the pandemic nowadays. Obesity is a chronic, complex and multiple cause pathology. There are several causes like genetic, biologic, social, economics, behavioral and ambient factors which interact through the physiological mediators of ingestion and energy consumption.

Adipose tissue, it is not only an energy storage tissue, but also it is an endocrine organ which can synthesise and secrete pro-inflammatory cytokines. It can cause chronic inflammation and neuroinflammation, which results in cognitive capacity problems. Linked with this inflammation problem there is a metabolic syndrome which includes insulin resistance and it causes Diabetes type 2. Obesity is an important risk factor to develop cardiovascular illnesses, locomotive system pathologies and some cancers. Children's obesity is associated with a higher probability of obesity, premature death and disability in old people.

There are two effective strategies which prevent obesity, standard diet and physical exercise. Both factors are intimately linked with our cerebral health.

There is a clear evidence of the anti-inflammatory properties of plant hormones like: curcumin, jasmonate, acetylsalicylic acid and abscisic acid (ABA). We want to highlight the role that plant hormone abscisic acid (ABA) can mean to prevent a massive neuroinflammation as a lot of preclinical and clinical studies show. Curcumin affects to multiple signaling ways, so it is a multidisciplinary therapy. Regarding neurological pathologies, curcumin prompts high levels of Vitamin E to Alzheimer patients, without adverse effect due to their anti-inflammatory properties. Jasmonate is a fatty acid produced by plants which play an important role in the defense against insects, deducing an inflammatory answer. 72 synthetic jasmonate has shown that it abolishes the activation of NF- $\kappa$ B, that induces anti-inflammatory answer.

In this project we study the beneficial effect that ABA to improve deleterious effects of neuroinflammation in a high-fat-diet animal model. ABA is a transversal molecule which can provoke important effects in animal organism (improve the tolerance to glucose; reduce the level of TNF- $\alpha$ ; and reduce adipocyte size in obesity models in a high-fat-diet. Consequently, ABA could be a therapeutic agent in the treatment of inflammatory and glucose resistance illnesses like Diabetes type 2. We focus on septum area due to the fact that this cerebral area makes a fundamental role in the regulation of hippocampus and spatial memory.

Our hypothesis is that neuroinflammation could affect septum area and it could induce the memory deficit observed in these animals. Previous studies had shown that ABA could

counteract cognitive defects of animals which were subjected to high-fat-diet. So, we would like to know if neuroinflammation in the septum area was correlated to spatial memory.

Por todo ello, podemos concluir que la neuroinflamación en septum se correlaciona con las alteraciones en memoria espacial observadas en animales sometidos a dieta grasa comparados con control.

To test our hypothesis, microglia cells in septum area's rats fed with standard diets or HFD, with or without ABA, were quantified. The process to quantify was done with non-knowledge of group assignments. The total number of reactive microglia cells marked with Iba1 antibody were quantified in two levels of septum area, out of the four experimental conditions.

The results show high-fat-diet increase neuroinflammation in septum area, while the treatment with ABA can counteract this effect. Curiously, the treatment with ABA respect to control diet also increased the number of positive cells to Iba 1.

On balance, neuroinflammation in septum area is correlated to alterations in spatial memory, which are observed in animals fed with high-fat-diet compared with control.

# **TÍTULO: “NEUROINFLAMACIÓN EN SEPTUM INDUCIDA POR DIETA GRASA”**

## **INTRODUCCIÓN**

La elevada tasa de sobrepeso y obesidad que presenta la población se ha convertido en la pandemia de nuestro tiempo. Desde 1980, la obesidad se ha más que doblado en todo el mundo. En 2014, el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso y el 13% eran obesas. En 2014, 41 millones de niños menores de 5 años tenían sobrepeso o eran obesos [1].

En el análisis del Institute of Health Metrics de 2013 se llegó a la conclusión que valores elevados de índice de masa corporal son el principal factor de riesgo de carga de enfermedad en España [2].

La obesidad es una patología crónica, compleja y con múltiples causas. Entre las que se incluyen la interacción de factores genéticos, biológicos, socioeconómicos, conductuales y ambientales actuando a través de mediadores fisiológicos de ingesta y gasto de energía [3].

El tejido graso, lejos de ser meramente un tejido de almacenamiento energético, es en sí mismo, un órgano endocrino que puede dar lugar a procesos de inflamación crónica, por una continua producción y liberación de citocinas pro-inflamatorias. Ligado a este estado de inflamación crónica tiene lugar el síndrome metabólico que incluye resistencia a la insulina que da lugar a Diabetes tipo 2 [4].

La obesidad constituye un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares [5], patologías del aparato locomotor, en especial la osteoartritis [6], algunos cánceres (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon) [7] y la neuroinflamación, que acarrea problemas en la capacidad cognitiva [8].

La obesidad infantil se asocia con una mayor probabilidad de obesidad, muerte prematura y discapacidad en la edad adulta [9].

Hay dos estrategias eficaces y que claramente previenen la obesidad, uno es la dieta equilibrada y el otro, el ejercicio físico [3]. Ambos factores, además están íntimamente relacionados con nuestra salud cerebral. Centrándonos en todo lo que abarca una dieta equilibrada, existe una gran evidencia de las propiedades antiinflamatorias de diversas fitohormonas. Ejemplos incluyen; la curcumina [10]; jasmonatos [11] y uno de los más conocidos, el ácido acetil salicílico [12].

La curcumina es un pigmento amarillo de la especia comino (*Curcuma longa*), que afecta a múltiples vías de señalización, por lo que se puede afirmar que constituye una terapia

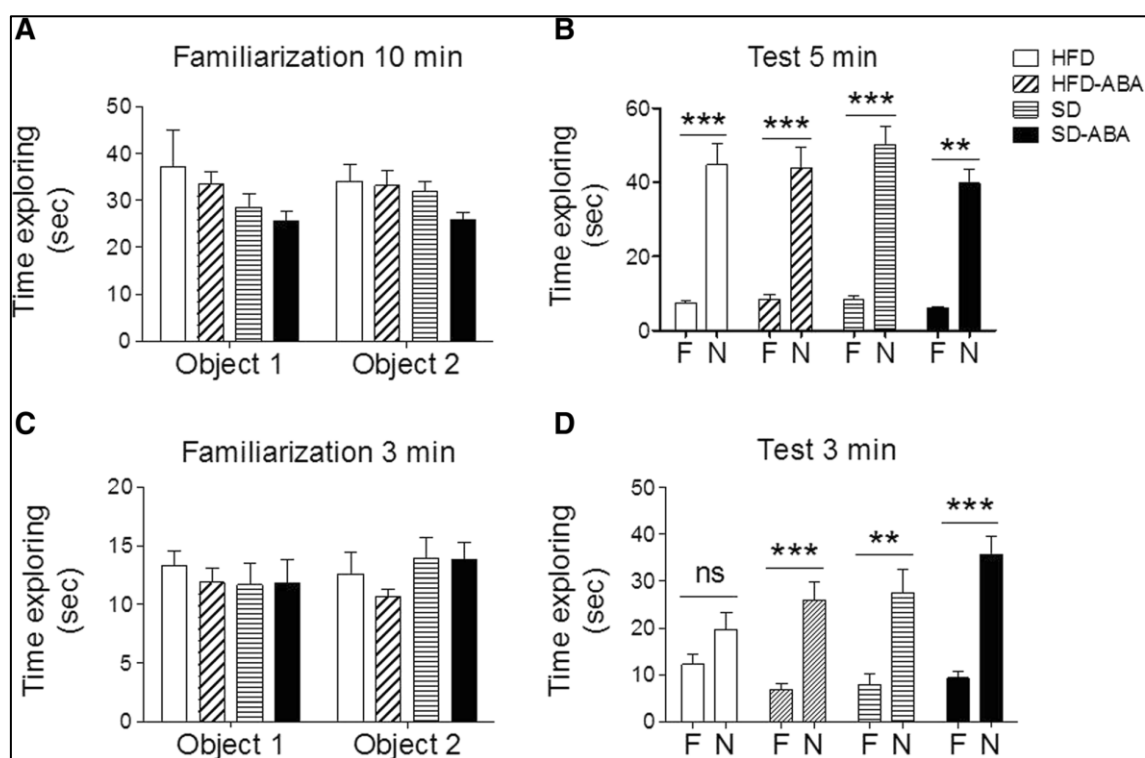
multidiana. Los papeles reguladores epigenéticos de la curcumina principalmente incluyen la inhibición de ADN metiltransferasas, modificación de histonas, los micro-RNA, vías proteosomales, metabolismo del glucógeno; efectos antiinflamatorios mediante la regulación de diversas citoquinas y factores de transcripción [10]. Numerosos ensayos preclínicos y clínicos indican que la curcumina parece tener potencial para intervenir sobre una amplia variedad de enfermedades crónicas: cáncer, cardiovasculares, inflamatorias, metabólicas, neurológicas, dermatológicas e infecciosas. Sin embargo, la eficacia terapéutica de la curcumina está dificultada por una inevitable pérdida de biodisponibilidad, la cual indica la velocidad y la cantidad de la forma inalterada de un fármaco que accede a la circulación sistémica y, por lo tanto, está disponible para acceder a los tejidos y producir un efecto. La biodisponibilidad de un fármaco depende no sólo de los procesos de absorción, sino también de los de distribución y eliminación. La curcumina presenta una pobre absorción, metabolismo rápido y acelerada eliminación sistémica. En cuanto a patologías neurológicas cabe destacar que en pacientes de Alzheimer, la curcumina induce niveles elevados de vitamina E, sin reacciones adversas, debido a sus propiedades antiinflamatorias. En el trastorno depresivo se ha demostrado, la curcumina modifica los biomarcadores y mejora el estado de ánimo. [10].

Los jasmonatos son ácidos grasos producidos por plantas y eucariotas inferiores que juegan un papel importante en la defensa contra insectos, induciendo para ello una respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que el jasmonato sintético J2, suprime la activación de NF  $\kappa$  B, lo que induce una respuesta antiinflamatoria [11].

En este trabajo queremos evaluar los efectos de la fitohormona ácido abscísico (ABA) para prevenir la neuroinflamación masiva inducida por una dieta rica en grasas. ABA es una hormona vegetal que cumple importantes funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas [15].

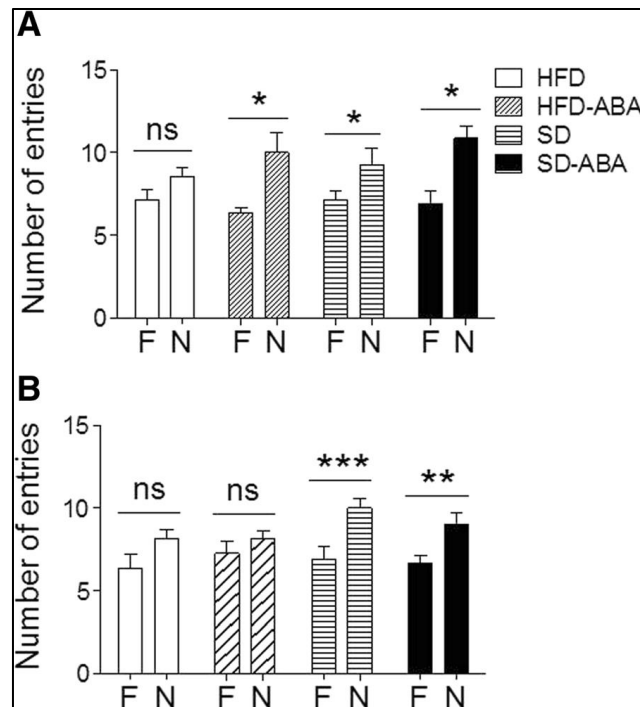
Al igual que otras fitohormonas, ABA es una molécula transversal que puede ejercer importantes efectos en organismos animales. Se ha documentado la mejora de la tolerancia a la glucosa [13]; reduce el nivel de TNF- $\alpha$ ; y disminuye el tamaño de los adipocitos en modelos de obesidad de una dieta ricas en grasas [14]. Por tanto, ABA se puede proponer como un agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y de resistencia a la insulina como puede ser la diabetes tipo 2.

Además de las propiedades de ABA en la periferia, anteriormente citadas, el grupo donde desarrollo el presente trabajo ha demostrado que ABA puede mejorar la capacidad cognitiva (Fig. 1 y Fig. 2) y los marcadores inflamatorios en cerebro en un modelo animal de neuroinflamación inducida por dieta grasa [15].



**Figura 1.** Prueba Nobel Object Recognition. Prueba (reconocimiento de objeto novedoso (NOR) sirve para determinar la memoria a corto plazo, basándose en la preferencia por explorar los objetos nuevos que de forma innata exhiben los roedores. No se observaron diferencias en la exploración de los dos objetos en la fase de familiarización (a y c). Cuando la familiarización fueron 5min, en la prueba, los 4 grupos pasaron mucho más tiempo explorando el objeto novedoso que el familiar, Sin embargo, cuando la familiarización era de 3min (tarea más difícil-) en las ratas con dieta grasa HFD, el tiempo para el objeto familiar y el novedoso no difirió significativamente, lo que sugiere un deterioro en el recuerdo del objeto familiar. Los animales HFD-ABA se comportaron de la misma manera que el control (SD y SD-ABA), lo que indica que ABA podría anular el deterioro inducido por HFD (d) [15].





**Figura 2.** Prueba del laberinto en T.

En la prueba del laberinto en T, se registran el número de entradas en los 2 brazos del laberinto, uno de los cuales era familiar (ya explorado durante la familiarización) y el otro novedoso porque permaneció cerrado durante la familiarización. Se observó que las ratas alimentadas con SD, SD-ABA y HFD-ABA realizaron un número significativamente mayor de entradas al brazo novedoso que al familiar. Sin embargo, este no fue el caso de los animales alimentados solo con HFD, lo que sugiere que la dieta podría perjudicar la memoria espacial. (a) Curiosamente, cuando la prueba se realizó con un tiempo mayor inter-ensayo entre familiarización y prueba, que puede implicar el ejercicio de una memoria de trabajo más difícil, HFD-ABA no logró subsanar el comportamiento de alternancia mostrado por el grupo HFD. Se observó que la diferencia entre el número de entradas a los 2 brazos ya no era significativo para animales HFD-ABA como ocurría en el grupo HFD. Tanto el SD como el SD-ABA mantuvieron una diferencia en el comportamiento exploratorio, entrando al brazo novedoso con mayor frecuencia. (b) [15].

El área septal está involucrada en la regulación del comportamiento, atención y memoria espacial [17], principalmente a través de conexiones colinérgicas que se establecen desde la zona central del septum (medial Septum) hacia el hipocampo [16].

En modelos experimentales de Alzheimer producidos en ratas mediante lesiones en los centros colinérgicos basalocorticales casi siempre existen discrepancias entre las alteraciones neuropatológicas observadas y los déficit comportamentales [18].

En cuanto a las alteraciones morfológicas seniles “fisiológicas” en primates no humanos en el sistema colinérgico se observa una disminución variable (incluso inapreciable) de neuronas en septum y núcleo basal de Meynert [19].

Se ha documentado una correlación significativa en la degeneración neurofibrilar del septum y los estadios iniciales de la enfermedad de Alzheimer mediante inhumohistoquímica realizada en autopsia de cerebro humano [20].

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La neuroinflamación en septum puede estar aumentada en ratas HFD (de acuerdo a un peor comportamiento en la memoria) y si ABA podría reparar también ese efecto que conlleva la neuroinflamación.

El objetivo consiste en evaluar los efectos de ABA en un modelo de neuroinflamación provocada por dieta rica en grasas

## **MÉTODOS**

Mediante la inmunohistoquímica se detectó el marcador citoplasmático específico de microglía, Iba-1 en el área septal de ratas Wistar macho agrupadas según el tratamiento en los siguientes grupos.

- Dieta control, (standartd diet, SD)
- Dieta control +20mg/L ABA (SD-ABA)
- Dieta alta en grasa (HFD)
- alta en grasa+ 20mg/L ABA (HFD-ABA)

Las ratas (la Janvier Labs (Saint-Berthevin, Francia) tenían 8 semanas de edad al inicio del experimento. El procedimiento relativo a la Directiva 86/609 / CEE de la Comunidad Europea sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos y experimentales. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Jaume I.

Los cuatro grupos se alimentaron ad libitum durante 12 semanas.

Administración de ABA, en agua de beber

## INMUNOHISTOQUIMICA

Las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital y perfundidas transcardiacamente con salina (0.9%) seguida de fijador paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4. Después de la perfusión, el cerebro fue retirado del cráneo y postfijado durante toda la noche a 4°C en el mismo fijador que fue usado para la perfusión. Al día siguiente, los cerebros fueron sumergidos en sacarosa al 30% durante 48 horas actuando como crioprotector, congelados a -80°C y cortes coronales de 40 µm de ancho fueron recopilados utilizando un microtomo Leica SM2010R (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania). Los cerebros fueron cortados en dirección rostro-caudal y de cada cerebro se recogieron seis series de cortes la cuales fueron almacenadas a -20°C para su análisis posterior.

Para la inmunohistoquímica de Iba1, marcador de microglía reactiva, se utilizó anti Iba1 (Abcam ab5076) diluido 1:500. Los cortes fueron enjuagados dos veces en solución salina tamponada con Tris (TBS) 0.05 M pH 8.0 y una vez en TBS con Triton X-100 al 0.2% a temperatura ambiente. Después, los cortes fueron incubados en solución de bloqueo para reducir el marcaje no específico. Luego, los cortes fueron incubados con anticuerpo primario diluido 1:500 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0.01 M a la que se añadió suero de asno normal al 2%, TBS con Triton X-100 al 0.2% y albúmina de suero bovino (BSA) al 2% durante 24 horas a temperatura ambiente.

Entonces, los cortes fueron incubados en la solución del anticuerpo secundario biotinilado (Jackson) a 1:200 diluido en TBS con Triton X-100. Dos horas después, los cortes fueron transferidos a la solución del complejo avidina-biotina-horseradish peroxidasa (Standard Elite ABC kit, Vector Laboratories) durante 90 minutos, seguido de dos enjuagues en TBS con Triton X-100 al 0.2%, y dos más en Tris/HCl 0.05 M pH 8.0. Después, los cortes fueron procesados en Tris/HCl 0.05 M pH 8.0 al que se añadió 3.125 mg de DAB y 2 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15-20 minutos. La reacción se detuvo añadiendo Tris/HCl 0.05 M pH 8.0 en exceso, seguido de varios enjuagues en PBS.

Finalmente, los cortes fueron montados sobre portaobjetos gelatinizados, secados al aire, deshidratados en alcohol, aclarados en xileno, y cubiertos con el cubreobjetos utilizando el medio de montaje DPX.

## ÁNÁLISIS DE IMAGEN

Microscopio Leica DM IL 521234 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) y una cámara Leica DFC450 C (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) conectada al software Leica

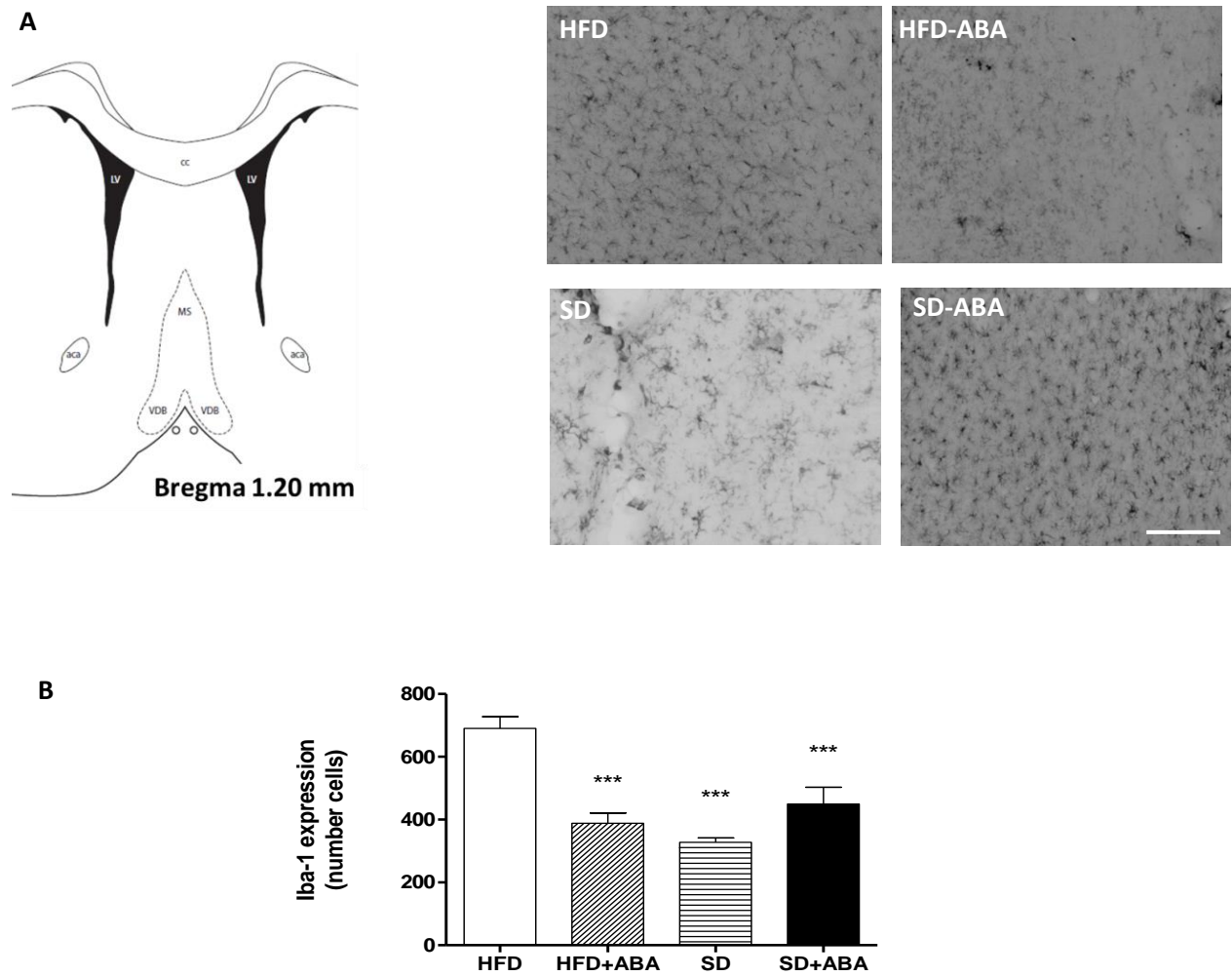
Application Suite Version 4.2.0 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) fueron empleados para adquirir las imágenes.

Contaje mediante el programa Image J (USA).

El proceso de cuantificación se realizó sin tener conocimiento de la asignación de los grupos.

Se cuantificó el número total de células de microglía reactiva marcadas con el anticuerpo Iba1 en dos niveles diferentes de septum (anterior y medial), de las cuatro condiciones experimentales: HFD, HFD+ABA, SD, SD+ABA.

RESULTADOS

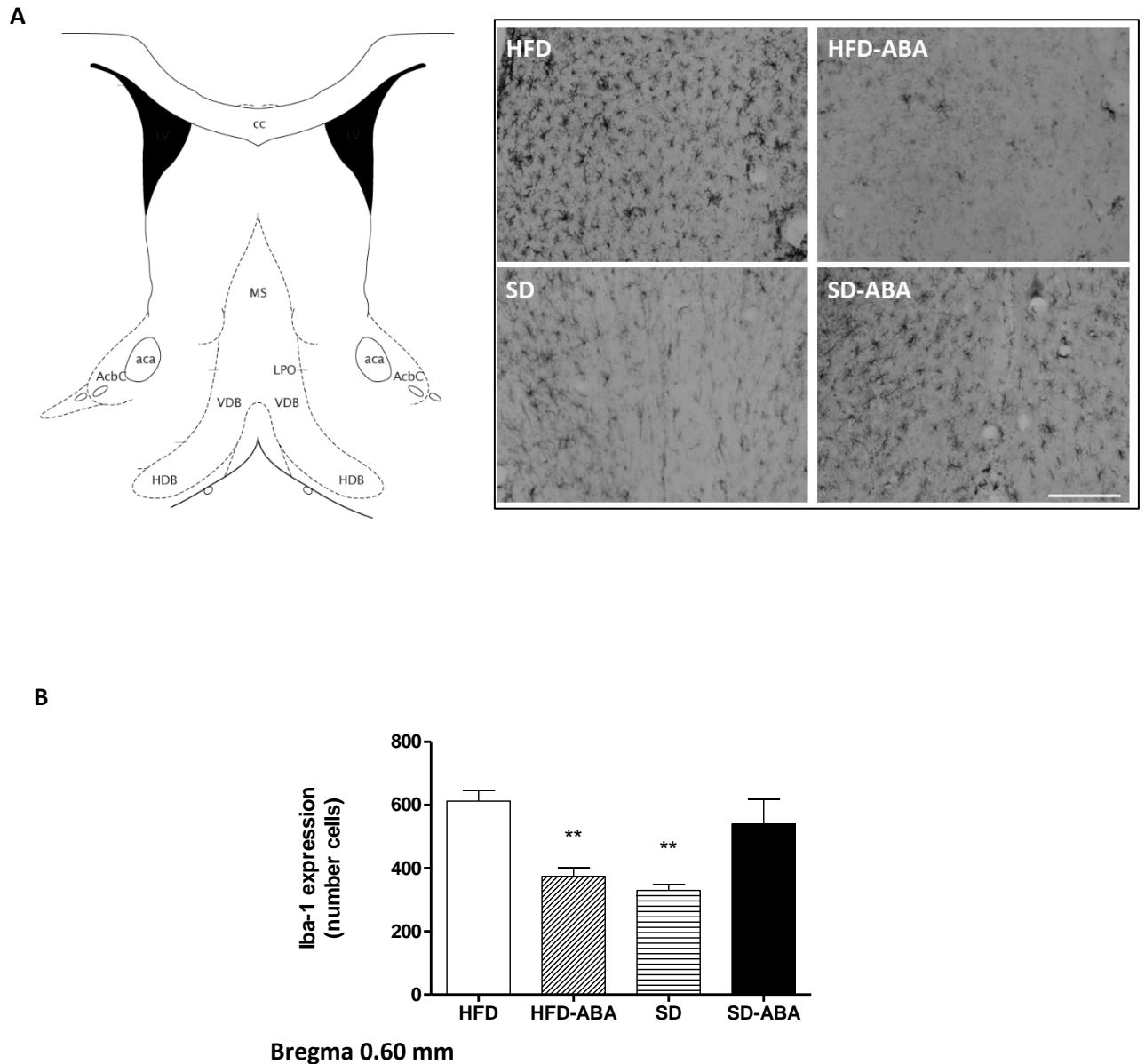


**Figura 3. Inmunohistoquímica de Iba-1 en septum anterior.** (A) Nivel Bregma donde se han tomado las imágenes representativas de los cuatro tratamientos, indicados en la imagen. (B) Cuantificación de células positivas. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM de número de células. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de un factor seguido de un test post hoc Newman-Keuls, \*\*\* $p < 0.001$  respecto a HFD  $\pi$  \* $p < 0.05$  ( $n=5$ ). Barra de calibración a 200  $\mu\text{m}$ .

SEPTUM ANTERIOR: La dieta grasa aumentó la microglía en área septal ( $690,4 \pm 36,93$ ) respecto a dieta control ( $327,6 \pm 13,89$ ) y ABA contrarresta este aumento ( $388,2 \pm 32,76$ ). Curiosamente, el tratamiento de ABA respecto a la dieta control también aumentó significativamente el número de células positivas para Iba1 ( $449,4 \pm 53,90$ ) (Fig 3B).

SEPTUM MEDIAL: La dieta grasa aumentó la microglía en área septal ( $612 \pm 33,68$ ) respecto a dieta control ( $329,8 \pm 19,23$ ) y ABA contrarresta este aumento ( $374,2 \pm 26,50$ ). Curiosamente, el tratamiento de ABA respecto a la dieta control también aumentó significativamente el número de células positivas para Iba1 ( $540,3 \pm 78,03$ ) (Fig 4B).

En la Figura 3C se muestra como el conteo de microglía en área septal tanto en un corte anterior y como en otro medial no difiere. Si vas a poner los datos de anterior y medial deberías poner el Bregma y las fotos del anterior, si no hay que quitarlo



**Figura 4. Inmunohistoquímica de Iba-1 en septum medial.** (A) Nivel Bregma donde se han tomado las imágenes representativas de los cuatro tratamientos, indicados en la imagen. (B) Cuantificación de células positivas. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM de número de células. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de un factor seguido de un test post hoc Newman-Keuls, \*\* $p < 0.01$  respecto a HFD  $\pi$  \* $p < 0.05$  ( $n=5$ ). Barra de calibración a 200  $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

El septum está formado por las paredes adelgazadas de los dos hemisferios cerebrales. Su origen bilateral puede estar indicado por una cavidad central. La degeneración de las neuronas colinérgicas del septum, es una característica de la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular, que se han correlacionado con el deterioro cognitivo. El septum medial proyecta sus fibras neuronales al hipocampo. Igualmente, se ha establecido que la pérdida neuronal dentro

del núcleo basal de Meynert correlaciona con el deterioro cognitivo que se produce en las demencias, tales como la enfermedad de Alzheimer.

El septum es muy susceptible a experimentar inflamación en animales sometidos a dieta grasa. La neuroinflamación en septum correlaciona con las alteraciones en memoria espacial observadas en animales sometidos a dieta grasa comparados con control. Los resultados obtenidos sugieren que ABA puede ayudar en estos casos, puesto que mejoró el comportamiento y el nivel de neuroinflamación.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. WHO. Global Status Report on non-communicable diseases 2014. Ginebra: World Health Organization. 2014. Disponible en: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>
2. Alberdi-Aresti G. Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población 2014– 2015: estudio ENPE adulta espan. Revista Española de Cardiología. 2016;69(6):579–87.
3. More R, Franch A, Gil-Campos M, Trabazo R. Obesidad Infantil. Recomendaciones del comité de nutrición de la asociación española de pediatría parte I. Prevención. Detección precoz. Papel del pediatra. Anales de pediatría. 2006;65(6):607–15.
4. Bastard PJ, Maachi M, Lagathu C, Kim JM, Caron M, Vidal H, Fève B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. European Cytokine Network. 2006;17:4–12.
5. Lavie CJ, McAuley PA, Church TS, Milani RV, Blair SN. Obesity and cardiovascular diseases: Implications regarding fitness, fatness, and severity in the obesity paradox. Journal of the American College of Cardiology. 2014;63(14):1345–54.
6. Berenbaum F, Eymard F, Houard X. Osteoarthritis, inflammation and obesity. Current Opinions in Rheumatology. 2013;25(1):114–18.
7. Vucenik I, Stains JP. Obesity and cancer risk: Evidence, mechanisms, and recommendations. Annals of the New York Academy of Sciences. 2012;1271(1): 37–43.
8. Cunningham C, Campion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JFC, Deacon RMJ, Perry VH. Systemic Inflammation Induces Acute Behavioral and Cognitive Changes and Accelerates Neurodegenerative Disease. Biological Psychiatry. 2009;65(4):304–12.
9. [[http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood\\_consequences/es/](http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_consequences/es/)]

10. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin, the golden nutraceutical: Multitargeting for multiple chronic diseases. *British Journal of Pharmacology*. 2016
11. Lee HJ, Maeng K, Dang HT, Kang GJ, Ryou C, Jung JH, Yoon D. Anti-inflammatory effect of methyl dehydrojasmonate (J2) is mediated by the NFB pathway. *Journal of Molecular Medicine*. 2011;89(1):83–90.
12. Alfonso L, Ai G, Spitale RC, Bhat GJ. Molecular targets of aspirin and cancer prevention. *British Journal of Cancer*. 2014;111(1):61–70.
13. Magnone M, Ameri P, Salis A, Andraghetti G, Emionite L, Murialdo G, De Flora A, Zocchi E. Microgram amounts of abscisic acid in fruit extracts improve glucose tolerance and reduce insulinemia in rats and in humans. 2015;29:4783–93.
14. Puce S, Basile G, Bavestrello G, Bruzzone S, Cerrano C, Giovine M, Arillo A, Zocchi E. Absciscic acid signaling through cyclic ADP-ribose in hydroid regeneration. *J Biol Chem*. 2004;279:39783–8.
15. Sanchez-Sarasua S, Moustafa S, Garcia-Aviles A, Lopez-Climent MF, Gomez-Cadenas A, Olucha-Bordonau FE, Sanchez-Perez AM. The effect of abscisic acid chronic treatment on neuroinflammatory markers and memory in a rat model of high-fat diet induced neuroinflammation. *Nutrition & Metabolism*. 2016;13:73.
16. Albert-Gascó H, García-Avilés Á, Moustafa S, Sánchez-Sarasua S, Gundlach AL, Olucha-Bordonau FE, Sánchez-Pérez AM. Central relaxin-3 receptor (RXFP3) activation increases ERK phosphorylation in septal cholinergic neurons and impairs spatial working memory. *Brain Structure and Function*. 2016:1–15.
17. Roland JJ, Stewart AL, Janke KL, Gielow MR, Kostek JA, Savage LM, Pang KCH. Medial septum-diagonal band of Broca (MSDB) GABAergic regulation of hippocampal acetylcholine efflux is dependent on cognitive demands. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34(2):506–14.
18. Toledano, A. ¿Existe la enfermedad de Alzheimer en todos los primates? Afección de Alzheimer en primates no humanos y sus implicaciones fisiopatológicas (I). 2012;27(6):354–69.
19. Lee S, Dan Y. Neuromodulation of Brain States. 2012;76(1):209–22.



20. Plowey ED, Ziskin JL. Hippocampal phospho-tau / MAPT neuropathology in the fornix in Alzheimer disease: an immunohistochemical autopsy study. *Acta Neuropathologica Communications*. 2016;1–13.